307—313　　23559(20)

动 物 学 研 究 1996，17（3）：307—313　　CN 53-1040／Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

涡鞭毛虫(甲藻)着丝粒／动粒蛋白的检查

吴传芬[1]　李靖炎[2]*　代嘉陵[2]　王永潮[1]
（1 北京师范大学生物系　北京　100875）
（2 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室　650223）

Q959.112

摘要　利用 ACA 血清、抗人着丝粒蛋白 B 的单抗和多抗、抗 CHO 细胞动粒蛋白的单抗，对典型涡鞭毛虫隐沟虫（隐甲藻）（*Crypthecodinium cohnii*）和特殊涡鞭毛虫尖尾虫（尖尾藻）（*Oxyrrhis marina*）的着丝粒／动粒蛋白进行了检查。用 ACA 血清作的荧光观察表明，隐沟虫的这些蛋白虽结合在核骨架上，但在间期时并不形成点状的前着丝粒。免疫印迹检查表明两种涡鞭毛虫的着丝粒蛋白 B 彼此一致，而且与四膜虫和眼虫的也高度一致。但用 ACA 血清作免疫印迹检查时，尖尾虫的蛋白虽与四膜虫和眼虫的相近，与隐沟虫的却有极大的差异。以抗动粒蛋白的单抗作此种检查时，尖尾虫与眼虫的反应带相同，而隐沟虫则与源真核生物（Archezoa）贾第虫（*Giardia lamblia*）的相同；而且隐沟虫和贾第虫都与几种原细菌有两条相同的反应带，其中 50 kD 的一条是尖尾虫和眼虫都没有的。上述发现不仅从一个新的方面支持了认为应把尖尾虫从典型涡鞭毛虫分出来独立为一个门的主张（李靖炎，1990），而且指出典型涡鞭毛虫在后真核生物（Metakaryota）中间是非常原始的。

关键词　涡鞭毛虫（甲藻）的分类，隐沟虫，尖尾虫，着丝粒／动粒蛋白，免疫印迹

涡鞭毛虫（甲藻）是一类极其特殊的单细胞真核生物。其染色体不仅在细胞周期中始终保持浓聚状态，而且在结构上相似于原核生物的类核体，并且像后者一样也不含组蛋白。因此我们曾把它们的核用作原始性细胞核的模型。但是如今看来这是不妥的，一则从细胞生物学和分子生物学的许多特征来看，涡鞭毛虫并非现存的最原始的真核生物；二则其染色体在结构上只是与真细菌类的类核体相似，并非与原细菌类的类核体相似，然而真核细胞却显然是从古代的原细菌起源的；第三个决定性的事实是，涡鞭毛虫染色体碱性蛋白在一级结构上与组蛋白相距甚远，而在产甲烷原细菌中已经找到了与组蛋白密切相关的“组蛋白相关蛋白”（histone-related proteins）。这些都说明涡鞭毛虫染色体的种种特殊之处其实是次生性的，而并不是原始的性状。但无论如何，涡鞭毛虫毕竟是一类很低等的真核生物。我们所作的 5.8S rRNA 分子进化研究（李靖炎，1992）表明，它们虽比源真核生物 Archezoa 高等，但却可能是后真核生物（Metakaryota）中间最低等的一类。因此检查它们的着丝粒蛋白仍是很有意义的。

* 通讯作者

本文 1995 年 8 月 4 日收到，同年 11 月 28 日修回

此外，从认识特殊涡鞭毛虫尖尾虫（*Oxyrrhis*）的进化地位，检查其着丝粒蛋白也是很有价值的，因为这是一类非常保守的蛋白。著名原生动物学家 J.O.Corliss（1983）把涡鞭毛虫类划分为两个门，一个是典型涡鞭毛虫，另一个则以特殊涡鞭毛虫（*Syndinium*）为代表。但李靖炎实验室的多年工作表明，尖尾虫距离典型涡鞭毛虫还更远。例如 *Syndinium* 的核分裂显然只是涡鞭毛虫核分裂（dinomitosis）的一种变形，而尖尾虫的核分裂却是相距甚远的核内有丝分裂（高小平等，1986）。因此显然更为恰当的是把尖尾虫独立为一个门，而把 *Syndinium* 作为典型涡鞭毛虫门的一个亚门（李靖炎，1990；张超英等，1996）。本工作检查和比较了尖尾虫和典型涡鞭毛虫的着丝粒蛋白，结果发现它们相距甚远，从而为尖尾虫独立为一个门的主张增添了又一个有力的新证据。

1 材料与方法

1.1 材料及培养

寇氏隐沟虫（隐甲藻）（*Crypthecodinium cohnii*）和尖尾虫（藻）（*Oxyhhris marina*）虫种及培养方法均由中国科学院昆明动物研究所进化细胞生物学实验室提供。前者用 E6 培养基在 20℃ 左右作无菌悬浮培养（Stein, 1973），后者培养方法也由该实验室提供（孙毓麟等，1978）。

对照材料人喉癌培养细胞 *Hep*Ⅱ用 1640 培养基，加入谷氨酰胺至 0.03%、胎牛血清至 10%、青霉素和链霉素分别至 100 u / ml，在 37℃ CO_2 培养箱内用培养瓶作单层贴壁培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞核的分离 （1）*Hep*Ⅱ细胞的核分离 收集对数生长的培养细胞，用 PBS 液洗涤 3 次，加入 RSB 液（0.01 M Tris-HCl，0.01 M NaCl，1.5 mM $MgCl_2$，pH7.4），加入 200 mM PSF 至终浓度为 1 mM，搅匀后冰浴放置。每 5 min 用次甲蓝（0.01%）染色检查 1 次，约 40 min 后细胞膨胀适度；离心弃 RSB。加入含 0.5%NP-40，0.2%脱氧胆酸钠的 RSB 液，加入 PMSF 至 1.2 mM，冰浴放置 10 min；匀浆使细胞核释放出来。加入含 0.05% Triton X-100 的 buffer A 至原体积之 10 倍，加入 PMSF 至 1.2 mM，搅匀后冰浴放置 10 min；离心弃上清液。用含 0.5% Triton X-100 和 1.2 mM PSF 的 RSB 液处理细胞核沉淀，加入 buffer A 搅匀。离心弃上清液，次甲蓝染色检查沉淀中核的纯度。通常经 1 次洗涤则可得到比较纯的细胞核，否则再洗涤处理 1 次即可。（2）寇氏隐甲藻细胞核的分离 离心收集对数生长期的寇氏隐甲藻，用适量体积的含 25% Ficoll 400（聚蔗糖 400）的 buffer A 悬浮细胞，超声处理使细胞核释放。分离和纯化细胞核的步骤与 *Hep*Ⅱ的相同，但酌情调整 g 值。

1.2.2 制备核骨架的细胞分级抽提 寇氏隐甲藻细胞的分级抽提：收集对数生长期的寇氏隐甲藻，用 Cook(0)液洗涤两次；用 Cook(2)液作悬浮冰浴处理 30 min，中途换液 1 次。用 CSK 液洗涤除去磷酸根。用 DNase Ⅰ消化液（含 DNase 200 u / ml）处理，用 DAPI 染色检查消化的进程，每 30 min 换液 1 次。消化完毕弃 DNase 液，用 Cook(0)-0.25 M 硫酸铵 4℃ 处理 5—10 min，Cook(0)洗 1 次，Cook(0)-2 M NaCl 4℃ 处理 5—10 min，Cook(0)洗涤制片做荧光染色。

1.2.3 制备核骨架的细胞核分级抽提与细胞的分级抽提的方法和步骤相同.

*Hep*Ⅱ细胞核的抽提与本文 1.2.1 中（1）相同。

1.2.4　间接免疫荧光染色　制片：收集对数生长期的材料，经 PBS（无钙、镁，以下同）洗涤 2 次，用细胞离心机将细胞离心于盖片上，空气干燥，在-20℃的固定液（丙酮：甲醇＝1：1）中固定 5-10 min，保存于-20℃冰箱中待用。

染色：载有固定材料的盖片经 PBS 洗 3 次，每次 5 min，ACA 血清 37℃孵育 1 h 或 4℃冰箱过液孵育；PBS 振荡洗涤 3 次，每次 5 min，甘油封片。用蓝光激发、观察和拍照。对照实验用正常人血清（杨新林提供）代替 ACA 血清，其余与上述过程相同。

1.2.5　免疫印迹　SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白制样：收集对数生长期细胞，用 PBS 洗 2 次，加入样品液，沸水浴中加热 10 min 裂解。使用前再补充加入适量 SDS，再用沸水浴加热处理 10 min。

1.3　抗体

一抗　ACA　血清是王永潮教授实验室与北京协和医院协作从国内硬化肌膜炎病人中筛选出的，并且已用这些血清做了一些研究工作，结果表明这些 ACA 血清对着丝粒的识别是特异的。

SH 血清由美国 Alabama 大学生物系 B. R. Brinkley 教授惠赠，也是一种 ACA 血清。

人着丝粒蛋白 B（CENP-B）单抗 mACA-2 和多抗 ra-ACA-2 均由美国 Johns Hopkins 医学院 William C. Earnshaw 教授惠赠。

CHO 细胞动粒蛋白单抗 mAb37A5 由加拿大 Laval 大学癌症中心 Ronal Hancock 教授惠赠。

二抗　FITC 标记的羊抗人 IgG 或辣根过氧化物酶标记的羊单抗人 IgG、羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 均为北京生物制品研究所和军事医学科学院产品。

1.4　溶液见免疫印迹技术的改进一文（吴传芬等，1996b）

2　结果

2.1　免疫荧光染色观察

经 ACA 血清作荧光染色后，隐甲藻的细胞核呈阳性反应，也分辨不出前着丝粒小点(图 1)。经盐抽提后，细胞核仍然还是作阳性反应（图 2)。尖尾藻的细胞核也作阳性反应。与眼虫的相似，尖尾藻的核仁位于核的中央，不被荧光染色。被荧光染色的部分在核内分布不均匀，但分辨不出点状结构。由于荧光太弱，拍照未成。

四膜虫、眼虫、寇氏隐甲藻和尖尾虫的荧光染色结果都不能区别出点状的着丝粒或前着丝粒。这是低等真核生物的共同特点，也是它们与高等生物的差异之处。

2.2　免疫印迹

2.2.1　ACA 血清印迹结果　用 ACA 血清作免疫印迹检查，隐甲藻有 5 条阳性反应带，集中分布在 50—60 kD 之间，其中 50 kD 带反应很强。此外在约 140 kD 处也有 1 条带(图 3)。在隐甲藻的细胞核蛋白样品中，经过盐抽提的细胞核蛋白样品以及除去 DNA 再用盐抽提的蛋白样品中，50—60 kD 之间的几条带仍然存在。但在 97—140 kD 之间出现了一些带，这些带反应很弱，而且分布密集（图 4)，表明图 3 中所示的阳性反应带存在于核中而且很可能与核骨架相结合。高分子量区新出现的那些弱反应带可能是因为这些抗

原含量太少以至在全细胞样品中难于检出。分离细胞核后这些蛋白在样中的浓度相对增大，从而得以显示。无论是全细胞蛋白样品还是细胞核样品，免疫印迹的阳性蛋白带的分布都与前述的 *Hep*II、四膜虫、眼虫的大不相同。这几种生物在阳性带的分布上基本是彼此一致的，从十几的低分子量区到 140 kD 左右的高分子量区都有分布。

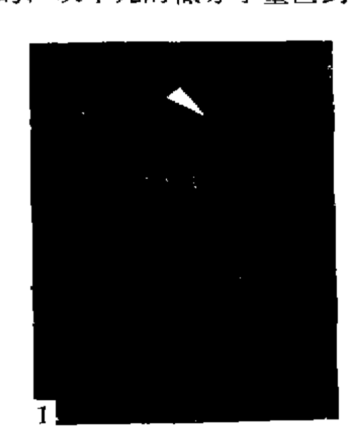


图1 寇氏隐甲藻间期细胞的ACA血清免疫荧光染色结果

Fig.1 The immuno-fluorescent staining of the interphose nucleus of *C. cohnii* by ACA anti-serum

箭头示被荧光标记的细胞核，分辨不出点状的前着丝粒（Arrow shows the stained nucleus. No spot-like procentromere can be identified）。

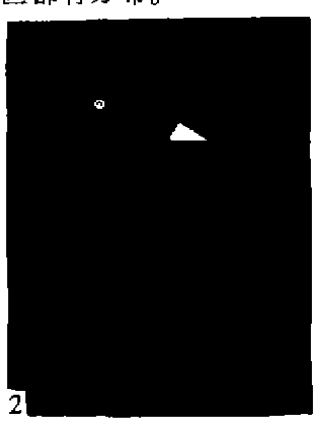


图2 经过制备核骨架的细胞分级抽提技术处理的寇氏隐甲藻间期细胞的 ACA 血清免疫荧光染色结果

Fig.2 The immuno-fluorescent staining of the interphase nucleus of *C. cohnii*, which has been trueated by sequential specific extractions for demonstrating nuclear matrix

箭头示细胞核（Arrow shows the exhached nucleus）。

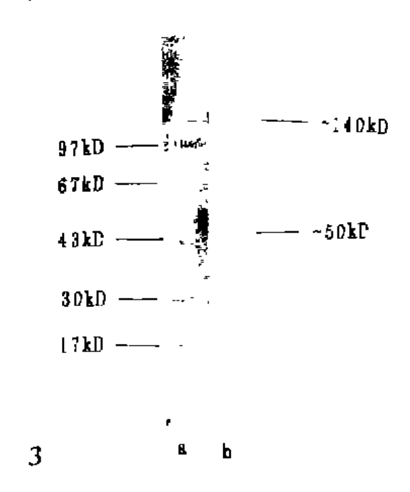


图3 寇氏隐甲藻细胞全蛋白的ACA血清免疫印迹的结果

Fig.3 The result of the immuno-blotting detection of the total proteins of *C.cohnii* by ACA anti-serum

a. 标准分子量蛋白（standard proteins for identifying molecular weights）；

b 寇氏隐甲藻样品（*C. cohnii*）。



图 4 ACA 血清免疫印迹结果

Fig.4 The results of immuno-blotting detection by ACA anti-serum

a. 寇氏隐甲藻细胞核全蛋白（The nucleus proteins of *C. cohnii*）

b 和 c，细胞核经过分级抽提后的蛋白样品（The nuclear proteins in the nucleus by sequntial specific extractions）。

尖尾虫对ACA血清的反应则有约18 kD、30 kD、40 kD、50 kD、60 kD、80 kD几条带（图5)。这个结果与隐甲藻的大不相同，却与*Hep*Ⅱ、四膜虫和眼虫的相似。但与它们不同的是分子量在80 kD以上区域没有出现阳性反应带（图5)。由于样品经过超声波处理，不知这个结果是否与此有关系，但可以看出尖尾虫与寇氏隐甲藻的差别很大，而与其它几种已检查过的生物更相似。

2.2.2 用抗CENP-B抗体作检查 以抗CENP-B的多抗ra-ACA作免疫电泳，尖尾虫和隐甲藻都同样显示出3条反应带，50 kD、60 kD、80 kD和眼虫、四膜虫的相同。以单抗mACA-2作检查，两种涡鞭毛虫都显示出1条80 kD的主带和120 kD、160 kD的副带。这也同样与四膜虫和眼虫的情况相同。两条副带所显示的可能是另外的蛋白。

2.2.3 以抗动粒蛋白的抗体所作的检查 以抗动粒蛋白的单抗mAb37A5所检查的结果表明，两种涡鞭毛虫彼此间有重要差异：尖尾虫显示出45 kD与120 kD的两条带（图6)，从而与眼虫的完全相同；隐甲藻则除这两条带外，还有50 kD的1条带，从而与源真核生物贾第虫的完全相同（吴传芬等，1996b)。四膜虫则只有120 kD的1条带。特别有意思的是，几种原细菌也有45 kD、50 kD的反应带，但是却没有120 kD的带（吴传芬等，1996b)。

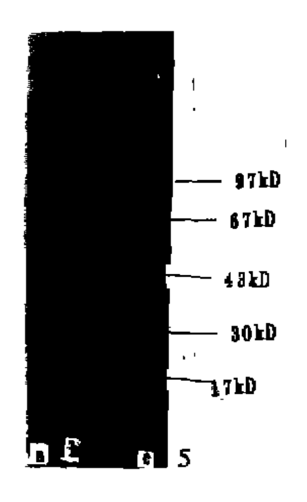


图5 尖尾虫细胞全蛋白的ACA血清免疫印迹的结果

Fig.5 The immuno-blotting detection of the total proteins of *Oxyrrhis marina* by ACA antiserum

a和b. 尖尾虫(*O. marina*)；

c. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

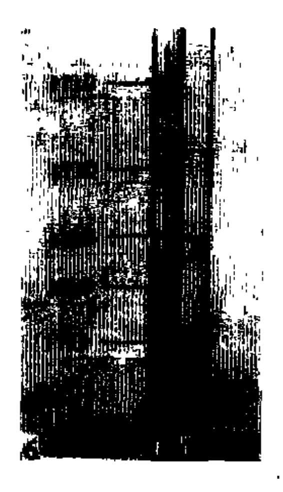


图6 mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.6 The immuno-blotting detections by monoclonal antibody, mAb37A5, against the kinetochore proteins of CHO cells

a 尖尾虫样品(*O. marina*)；

b 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。



图7 mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.7 The immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against the kinetochore proteins of CHO cells

a. 寇氏隐甲藻样品(*C. cohnii*)；

b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

3 讨论

中国科学院昆明动物研究所进化细胞生物学实验室多年来对尖尾虫（藻）进行了多方面的研究（一部分是上海细胞所的同志完成的）表明，尖尾虫与典型涡鞭毛虫在一系列的细胞生物学和分子生物学特征上有很大的差异（张超英等，1996）。在此基础上，李靖炎（1990）不赞成 Corliss（1983）把涡鞭毛虫划分为典型涡鞭毛虫门和以合沟虫（*Syndinium*）为代表的合沟虫门的主张，而提出应建立一个以尖尾虫为代表的尖尾虫门（Phylum Oxyrrhinea），与典型涡鞭毛虫门相对，并把合沟虫类列为后者的一个亚门。

本工作为上述的主张提供了又一个有力的新证据。

着丝粒／动粒蛋白在进化上相当保守，例如利用 ACA 血清进行免疫电泳检查，纤毛虫与眼虫的竟会与人喉癌细胞的高度地一致。在这种情况下，尖尾虫与眼虫、四膜虫等的是较为接近的，与典型涡鞭毛虫的却相距太远。

以抗着丝粒蛋白 B（CENP-B）的抗体所作的检查未能发现尖尾虫、典型涡鞭毛虫、眼虫、四膜虫和人喉癌细胞之间有什么差异。但是以抗动粒蛋白的抗体所作的检查，却显示出从原细菌到四膜虫的进化路线：几种原细菌都有 40、45 和 50 kD 的 3 条反应带；进化到贾第虫和典型涡鞭毛虫就变成 45、50 和 120 kD 的 3 条带；到尖尾虫和眼虫就只剩下 45 和 120 kD 的两条带；而到纤毛虫类中的四膜虫则只剩下 120 kD 的 1 条带。应强调的是尖尾虫在这方面与眼虫是一致的，而典型涡鞭毛虫却与源真核生物贾第虫的相同。这除了显示出尖尾虫与典型涡鞭毛虫间的巨大差异外，还显示出典型涡鞭毛虫原始的一面，虽则它们是高度特化的一枝，其染色体的种种奇特特性是由于失去了组蛋白而次生性地造成的。

参 考 文 献

李靖炎，1992. 削偶合今祖法的提出. 动物学研究，13(4)：387—396.

孙敏麟，范佩芳，商伟明等，1979. 尖尾藻（*Oxyrrhis warina*）染色质的酸溶性蛋白的分析. 1978. 实验生物学报，11(2)：297-302.

吴传芬、代嘉陵、李靖炎等，1996a. 免疫印迹技术的一些改进. 动物学研究，17（3）：315—322.

吴传芬，李靖炎，代嘉陵等，1966b. 源真核生物贾第虫与原细菌着丝粒／动粒蛋白的免疫印迹检查. 动物学研究，17（3）：323—330.

张超英、曾丛梅，李靖炎，1996. 特殊涡鞭毛虫——尖尾虫染色体与典型涡鞭毛虫染色体的比较. 动物学研究，17（3）：331—336.

Corliss J O, 1983. The Kingdom Protista and its 45 phyla. Biosystems, 17: 87-162.

Gao Xiao-ping, Li Jing-yan, 1986. The nuclear division of the marine dinoflagelate *Oxyrrhis marina*. *J. Cell Science*, 86: 161-175.

Li Jing-yan, 1990 *Oxyrrhis marina* observed from the viewpoint of evolutionary cell biology. First Intern. Symposium on free-living heterotrophic flagellates (Aug. 6-11, 1990, Helsingor, Denmark). Program and Abstracts.

THE DETECTION OF CENTROMERE / KINETOCHORE PROTEINS IN TYPICAL DINOFLAGELLATE AND *Oxyrrhis*

Wu Chuanfen[①] Li Jingyan[②*] Dai Jialing[②] Wang Yongchao[①]

(①*Beijing Normal University, Beijing*, 100875)

(②*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Scinces, Kunming*, 650223)

Abstract

When typical dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*, was detected with immuno-fluorescent microscopy, its nucleus gave positive reaction to ACA serum against human centromere / kinetochore proteins. However, in its nucleus, just as in nuclei of *Tetrahymena* and *Euglena*, spot-like precentromeres have never been found.

The immuno-blotting detections with the monoclonal antibody, mACA-2, against human centromere protein, CENP-B, showed that *Crypthecodinium* and the special dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*, gave the same result which was correspondent with those given by *Tetrahymena*, *Euglena* and human *Hep*-2 cells. With the CENP-B polyclonal antibody, ra-ACA-2, the two dinoflagellates, other protists and *Hep*-2 cells also gave the results identical to each. These results indicated that CENP-B was highly conservative in eukaryotic evolution.

In fact, all the centromere / kinetochore proteins are quite conservative. Therefore, in the immuno-blotting detections done with ACA serum, the positive bands of *Tetrahymena* and *Euglena* are quite similar to those of human *Hep*-2 cells. The bands of the special dinoflagellate, *Oxyrrhis*, are similar to other protists. although a few bands are absent. However, the bands of typical dinoflagellate are obviously different from *Oxyrrhis* and other eukaryotes. It means that two dinoflagellates are far from each other.

The results obtained with the monoclonal antibody, mAb37A5, against the kinetochore proteins of CHO cells, also proposed the above suggestion. In the detections, *Tetrahymena* gave only a 120 kD band; *Euglena* and *Oxyrrhis* gave two bands (45 kD and 120 kD), while *Crypthecodinium* and archezoan, *Giardia*, gave three bands (45 kD, 50 kD and 120 kD). It is very interesting that various archaebacteria all gave the 45 kD band and the 50 kD band (the third band is of 40 kD) (Wu *et al.*, 1996b).

The results described above support the proposal that dinoflagellates should be distinguished into two phyla: Phylum Oxyrrhinea and Phylum Peridinea (Li, 1990; Zhang et al., 1996).

Key words Major classfication of dinoflagellates, *Crypthecodinium cohnii*, *Oxyrrhis marina*, Cetromere / kinetochore proteins, Immuno-blotting

* Correspondent author